



TITLE:

Roles of vinexin family proteins in sensing the stiffness of extracellular matrix(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ichikawa, Takafumi

CITATION:

Ichikawa, Takafumi. Roles of vinexin family proteins in sensing the stiffness of extracellular matrix. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20587>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2020-07-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	市川 尚文
論文題目	Roles of vinexin family proteins in sensing the stiffness of extracellular matrix (細胞外マトリックスの硬さの感知におけるビネキシnfファミリータンパク質の役割)		
(論文内容の要旨)			
<p>動物細胞の周囲に存在するコラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM) は、多様な細胞外微小環境を形成する。ECMの架橋程度や密度により規定される「硬さ」は、細胞の遊走や増殖、分化などの細胞の運命を調節する。そのため、細胞がECMの硬さを感じ、自身の運命を決定する仕組みを明らかにすることは、増殖や分化を制御する必要のあるがん治療や再生医療において重要である。細胞はECMとの接触部位に、ECM受容体と様々な裏打ちタンパク質を含む接着斑を形成する。細胞はアクチン繊維が生み出す張力でECMを引っ張ることで、ECMの硬さを感じていると考えられている。軟らかいECM上に比べて、硬いECM上ではより強い張力が発生していることから、ECMの硬さに応じて接着斑に繋ぎ止めるアクチン繊維の量を調節する「メカノセンサー」が存在していると予想されている。これまでの研究で、ECMの硬さに応じて接着斑タンパク質ビンキュリンがアクチン繊維高親和型に構造変化すること、それには別の接着斑タンパク質ビネキシンαが必要であることが示唆されていた。本研究ではビネキシンαとそのファミリータンパク質に着目し、ECMの硬さの感知におけるそれらの役割を明らかにした。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>第1章では「硬いECM上でビネキシンαとビンキュリンの結合量が増加し、それがビンキュリンをアクチン繊維高親和型へと移行させることで、ECMの硬さに応じた細胞の挙動を調節する」という仮説を立て、これを検証した。まず、硬さの異なるポリアクリルアミドゲル培養基板上でマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を培養し、ビンキュリンとビネキシンαとの結合を免疫沈降法により調べた。軟らかい基板上に比べて硬い基板上ではビネキシンαと共沈降するビンキュリン量が増加していた。次に、ビンキュリンの構造を評価することのできるFRET (蛍光共鳴エネルギー移動) プローブを用いたin vitro実験を行い、ビネキシンαがビンキュリンに結合することが直接アクチン繊維高親和型ビンキュリンを増加させることを明らかにした。さらに、ECMの硬さに依存した細胞遊走の変化におけるビネキシンαの役割を創傷治癒アッセイにより評価した。野生型MEFは基板が硬いときほど速く細胞遊走したが、ビネキシン遺伝子欠損MEFは基板の硬さに応じた遊走速度の変化を示さなかった。以上より、「ビンキュリン-ビネキシンα複合体はECMの硬さを感じ、細胞遊走速度を制御するメカノセンサーである」というモデルを提唱した。</p>			

ビネキシン α は哺乳類ではCAP、ArgBP2と共に、タンパク質ファミリーを形成している。これらはいずれもN末端側に機能未知なSoHoドメインを1つと、C末端側にタンパク質間相互作用ドメインであるSH3ドメインを3つ有するアダプタータンパク質である。第2章では、「ビネキシンファミリータンパク質がいずれもECMの硬さの感知に関与し、機能重複する可能性がある」と考え、ビネキシンファミリータンパク質を単独で発現するMEFを作製し、3者の機能を比較解析した。まず、ビネキシン/CAP二重欠損マウスよりMEFを単離し、内在性ArgBP2をRNA干渉法により発現抑制することで三重欠損MEFを作製した。その後、ビネキシン α 、CAP、ArgBP2をそれぞれ単独で安定的に再発現する細胞を取得した。再発現MEFにおける3者の局在を確認したところ、ビネキシン α とCAPは接着斑上でビンキュリンと共局在したのに対して、ArgBP2は主にアクチン繊維上でアクチン繊維架橋タンパク質 α -アクチニンと共局在した。次に、ECMの硬さに応じたビンキュリンの挙動の変化に与える3者の影響について検討したところ、ビネキシン α とCAPは硬いECM上でアクチン繊維高親和型ビンキュリンを増加させたが、ArgBP2は影響を与えなかった。こうしたビネキシンファミリータンパク質間でのビンキュリンに対する効果の違いは、ビンキュリンに対する各メンバーの結合能の違いによる可能性があると考え、それぞれの精製タンパク質を用いた共沈降実験を行った。その結果、ビネキシン α とCAPはビンキュリンを共沈降させたが、ArgBP2はビンキュリンを共沈降させなかった。一方で、ArgBP2のみが α -アクチニンを共沈降させることが明らかになった。さらに、ArgBP2は α -アクチニンをアクチン繊維上で不動化し、強い細胞収縮力の発生に寄与していた。以上より、ビネキシンファミリータンパク質のうち、ビネキシン α とCAPは共にECMの硬さに応じてビンキュリンの挙動を制御する一方で、ArgBP2は α -アクチニンの挙動を制御し、細胞収縮力を調節するという異なる機能を持つことが明らかになった。

第3章では、ECMの硬さに応じたビンキュリンの挙動の変化における、ビンキュリンとアクチン繊維の結合の必要性を評価した。そのためにアクチン繊維との結合能が低下するビンキュリン変異体を作製し、ビンキュリンの挙動（CSK緩衝液不溶性および接着斑における不動性）を調べた。野生型と異なり変異体では硬さに応じたビンキュリンの挙動の変化が有意に抑制されていた。このことから、ECMの硬さに応じたビンキュリンの挙動の変化にはビンキュリンとアクチン繊維との結合が必要であることが明らかになった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

動物細胞を取り巻く細胞外マトリックス (ECM) の硬さは細胞の遊走や分化、増殖などを調節する。細胞はアクチン繊維をECMとの接着部位である接着斑に繋ぎ止め、ECMを引っ張ることでECMの硬さを感知していると考えられている。そのため、接着斑はECMの硬さの感知において重要な役割を担っていると考えられているが、その詳細はよく分かっていなかった。本論文は接着斑タンパク質ビンキュリンとその結合タンパク質であるビネキシン α 、さらには他のビネキシンファミリータンパク質であるCAPとArgBP2に焦点を当て、ECMの硬さを感知する分子メカニズムを解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ビネキシン α は硬いECM上でビンキュリンと結合し、その結合はアクチン繊維高親和型ビンキュリンを増加させることを明らかにした。
2. ビネキシン α は硬いECM上での速い細胞遊走に必要であることを明らかにした。
3. ビネキシンファミリータンパク質のうち、CAPもビネキシン α と同様にECMの硬さに応じたビンキュリンの挙動を調節することを明らかにした。一方で、ArgBP2はビンキュリンの挙動の調節に関与しないことを明らかにした。
4. ArgBP2はアクチン繊維架橋タンパク質 α -アクチニンの挙動を調節し、細胞収縮力を増強させる機能を持つことを明らかにした。
5. ECMの硬さに応じたビンキュリンの挙動の変化にはアクチン繊維との結合が必要であることを明らかにした。

以上のとおり、本論文はビンキュリンとビネキシンファミリータンパク質がECMの硬さを感知して細胞の運命を調節する仕組みを明らかにしたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学および基礎生理学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年4月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）